

Chromatographic separation of plasma proteins.

Publication number: EP0359593

Publication date: 1990-03-21

Inventor: BURNOUF THIERRY; BURNOUF MYRIANA

Applicant: CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION (FR)

Classification:

- **international:** A61K38/16; A61K38/43; C07K1/18; C07K14/435;
C07K14/745; C07K14/755; C07K14/78; A61K38/16;
A61K38/43; C07K1/00; C07K14/435; (IPC1-7):
A61K35/16; C07K3/22; C07K15/06

- **european:** C07K14/755

Application number: EP19890400348 19890208

Priority number(s): FR19880007530 19880607

Also published as:

-  WO8912065 (A1)
-  US5252709 (A1)
-  SU1837880 (A3)
-  FR2632309 (A1)
-  DK29990 (A)

[more >>](#)

Cited documents:

-  WO8604486
-  EP0176926
-  EP0237981

[Report a data error here](#)

Abstract not available for EP0359593

Abstract of corresponding document: **WO8912065**

Process for separating proteins from a fraction of human or animal plasma, in which a solubilized fraction of cryo-precipitated plasma is made to undergo a single stage of chromatography on an anion exchange resin having a moderate ion character enabling the actuation of hydrophobic interactions, which does not absorb certain proteins and fixes others, which are then eluted by increasing the ion strength of the buffer by adding NaCL. The process of the invention can be used in particular to obtain a concentrate of factor VII of high purity which can be used for the treatment of A haemophilia. The process also provides a means of obtaining concentrates of fibrinogen, von Willebrand factors and fibronectine.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 359 593
A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 89400348.2

⑮ Int. Cl.⁵: C 07 K 3/22
C 07 K 15/06
// A61K35/16

⑭ Date de dépôt: 08.02.89

⑩ Priorité: 07.06.88 FR 8807530

⑪ Date de publication de la demande:
21.03.90 Bulletin 90/12

⑫ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑯ Demandeur: CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION
SANGUINE DE LILLE
19-21 rue Camille Guérin
F-59012 Lille (FR)

⑰ Inventeur: Burnouf, Thierry
5 rue du Docteur Schaffner
F-59136 Wavrin (FR)

Burnouf Myriana
5 rue du Docteur Schaffner
F-59136 Wavrin (FR)

⑲ Mandataire: Lhuillier, René et al
ARMENGAUD JEUNE CABINET LEPEUDRY 6, rue du Fg.
St-Honoré
F-75008 Paris (FR)

Le titre de l'invention a été modifié (Directives relatives à l'examen pratiqué à l'OEB, A-III, 7.3)

⑳ Séparation chromatographique des protéines du plasma.

㉑ L'invention concerne un procédé de séparation de protéines à partir d'une fraction de plasma humain ou animal.

Selon ce procédé on soumet une fraction solubilisée de plasma cryoprécipité à une étape unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'anions de caractère ionique modéré et permettant la mise en jeu d'interactions hydrophobes qui n'adsorbe pas certaines protéines et en fixe d'autres, que l'on élue ensuite par augmentation de la force ionique du tampon par addition de NaCl.

La mise en oeuvre du procédé de l'invention permet notamment d'obtenir un concentré de Facteur VIII de haute pureté utilisable pour le traitement de l'hémophilie A. Le procédé permet également d'obtenir des concentrés de fibrinogène, de facteur von Willebrand et de fibronectine.

EP 0 359 593 A1

Description**Procédé de séparation par voie chromatographique de protéines du plasma, concentrés de protéines obtenus, notamment de Facteur VIII, de fibrinogène, de facteur von Willebrand et de fibronectine.**

L'invention concerne la séparation de protéines d'une fraction de plasma humain ou animal par chromatographie d'échange d'anions selon une technique permettant d'obtenir en une seule étape un taux de purification très important, notamment du Facteur VIII, du fibrinogène et du facteur von Willebrand.

La mise à disposition de protéines du sang nécessite, pour leur utilisation à des fins thérapeutiques, des techniques de purification permettant d'obtenir des produits de haute pureté et totalement dépourvus de contaminants, notamment d'autres protéines ou de substances d'origine étrangère telles que des anticorps.

Ainsi, il est essentiel, dans le traitement de l'hémophilie A, de disposer de concentrés de Facteur VIII de très haute pureté en effet, les malades subissent des injections nombreuses et répétées de concentrés de Facteur VIII et, simultanément, de quantités importantes de fibrinogène et d'immunoglobulines qui peuvent induire des réponses immunitaires indésirables. Ainsi des injections répétées de Facteur VIII insuffisamment purifié ne peuvent être réalisées qu'avec des concentrés de plasmas isogroupes pour éviter les accidents typiques des transfusions dûs aux différences de groupes sanguins et provoqués par la présence d'immunoglobulines.

Les concentrés de Facteur VIII sont le plus souvent préparés à partir d'une fraction de plasma humain cryoprécipité. La pureté des concentrés de Facteur VIII généralement obtenus dans les centres industriels de traitement du plasma humain est souvent de l'ordre de 1 UI/mg et n'excède généralement pas les limites de 10 à 20 UI/mg. Les techniques de production classique font appel à des étapes de précipitation qui visent à éliminer, souvent très imparfaitement, les contaminants protéiques tels que le fibrinogène, la fibronectine, et les immunoglobulines. Ces techniques peuvent utiliser ou combiner une précipitation à faible température (10°C), ou l' adjonction d'agents de précipitation des protéines ; ainsi des polymères hydrophiles tels que le PEG (Newman et al., Br. J. Haematol 21:1-20, 1971 ; Hao et al., in Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press 1980, pp.57-74), la polyvinylpyrrolidone (Casillas et Simonetti, Br. J. Haemato., 50:665-672, 1982), le dextran, le Ficoll, le Percoll, l'amidon hydroxyéthylé et l'albumine ont été proposés comme agents de précipitation du Facteur VIII (Farrugia et coll., Thromb Haemostas, 51:338-342, 1984). Il en est de même de l'usage de glycocolle et de chlorure de sodium préconisé par Thorell et Blömbäck. De la même façon, certains auteurs (Ng et al., Thrombosis Res., 42:825-834, 1986) ont réussi à combiner trois agents de précipitation qui sont le PEG, le glycocolle, et le chlorure de sodium pour obtenir des concentrés de Facteur VIII à activité spécifique comprise entre 10 et 16 UI/mg.

On a fait appel aussi à des techniques de chromatographie d'exclusion stérique, ou tamisage moléculaire, qui visent à la récupération d'une fraction de haut poids moléculaire contenant le complexe Facteur VIII:C-facteur von Willebrand partiellement dépourvu de fibrinogène. Cette technique fournit à faible rendement un produit dont l'activité spécifique ne dépasse pas 30 UI/mg et qui requiert l'adjonction d'albumine comme stabilisant (conduisant à un abaissement de l'activité spécifique à environ 3 à 5 UI/mg). Cette technique pose quelques problèmes d'adaptation à grande échelle car il est difficile de maintenir constant dans le temps le pouvoir de résolution des colonnes industrielles de tamisage moléculaire.

Des concentrés de Facteur VIII ont été produits également en intégrant au protocole de production un contact avec des billes de silice poreuse destinées à emprisonner les contaminants protéiques de faible poids moléculaire (Margolis et al., Vox Sang. 46:341-348, 1984). L'activité spécifique du produit reste relativement faible : 1UI/mg.

Des techniques nouvelles sont récemment apparues dans la préparation de concentrés de Facteur VIII de très haute pureté. Ainsi les firmes Hyland et Travenol ont elles proposé des concentrés obtenus par des méthodes de chromatographie d'immunoaffinité (Zimmerman et Fulcher, Thrombosis Res., Suppl. VII, p. 58, 1987 ; Berntorp et Nilsson, Thrombosis Res., Suppl. VII, p.60, 1987 ; Levine et al., Thrombosis Res., Suppl. VII, 1987). Ces techniques consistent à purifier le Facteur VIII à l'aide d'anticorps anti-Facteur VIII:C ou anti-facteur von Willebrand immobilisés sur un support chromatographique. Ces techniques sont performantes mais exigent l'emploi de solutions drastiques pour désorber le Facteur VIII soit de son anticorps soit du facteur von Willebrand. Une étape supplémentaire d'ultrafiltration visant à éliminer les agents chimiques indésirables est donc nécessaire mais elle peut nuire à l'activité biologique du Facteur VIII. L'activité spécifique du Facteur VIII peut atteindre 1000 à 3000 UI/mg en cours de production, mais sa fragilité exige l'adjonction d'un stabilisant, tel que l'albumine, avant l'étape de lyophilisation, ce qui réduit l'activité spécifique du Facteur VIII à 3 à 5 UI/mg. L'inconvénient majeur de la purification par immunoaffinité est néanmoins la présence d'anticorps résiduels ; ceux-ci étant d'origine murine, ils peuvent entraîner chez les malades l'apparition de réactions immuno-ologiques vis-à-vis de ces protéines étrangères à l'organisme humain.

On a également utilisé des techniques de chromatographie d'échange d'ions, mais compte tenu de la complexité des processus opératoires et des faibles rendements obtenus, ces techniques sont restées au stade du laboratoire.

Ainsi l'article de J.J.Morgenthaler (Thromb. Haemostas., Stuttgart, 47(2) 124 - 127 (1982) étudie la purification de Facteur VIII:C à partir de précipité au

polyéthylèneglycol par passage sur une résine de Sepharose modifiée. Aucune indication n'est donnée sur le rendement et la reproductibilité des différentes techniques testées.

Il est donc tout à fait essentiel de disposer de nouvelles méthodes d'obtention de concentrés de protéines, et notamment de Facteur VIII, applicables à l'échelle industrielle et donnant des produits de très haute pureté, totalement dépourvus de protéines d'origine étrangère telles que des anticorps d'origine animale.

La Demanderesse a ainsi mis au point un procédé de purification par chromatographie d'échange d'anions, qui, grâce à un choix judicieux de la résine utilisée, permet de séparer sur une seule colonne chromatographique les protéines recherchées dans des conditions suffisamment ménagées pour rendre inutiles les traitements ultérieurs, tels que l'ultrafiltration, qui augmentent la complexité du procédé et diminuent l'activité de la protéine purifiée.

L'invention concerne donc un procédé de séparation de protéines du plasma, et plus particulièrement de Facteur VIII, de fibrinogène, de fibronectine et de facteur von Willebrand, caractérisé en ce qu'on soumet une fraction solubilisée d'un cryoprécipité de plasma humain à un traitement par voie chromatographique sur une résine échangeuse d'anions de caractère ionique relativement modéré et permettant également la mise en jeu d'interactions hydrophobes, qui n'adsorbe pas certaines protéines et qui en fixe d'autres que l'on élue ensuite spécifiquement par augmentation de la force ionique du tampon.

Le procédé est également applicable à un plasma d'origine animale, par exemple porcine, pour les cas particuliers de malades hémophiles à sérum inhibiteur qui ne peuvent pas être traités avec du Facteur VIII d'origine humaine.

On peut ainsi utiliser comme fraction de départ une fraction de plasma cryoprécipité ayant éventuellement subi un traitement de pré-purification. Ce traitement préalable peut consister par exemple en une précipitation au gel d'alumine et/ou une précipitation à basse température selon les techniques classiques de traitement de telles fractions.

Parmi les différentes résines testées pour la séparation chromatographique, on a observé que les résultats les plus satisfaisants étaient obtenus en utilisant des groupements DEAE greffés sur un gel de polymère vinylique, tel que le Fractogel TSK. Une résine de ce type est disponible dans le commerce sous l'appellation Fractogel TSK-DEAE 650 (M) (Merck). Ce support chromatographique a fourni des résultats nettement supérieurs aux autres gels testés, comme la DEAE-Sépharose CL-6B, DEAE-Sépharose CL-6B Fast-Flow (Pharmacia), DEAE-Sépharose 4B ou la DEAE-Trisacryl LS (IBF).

L'utilisation d'un gel semblable au Fractogel-TSK-DEAE(M) a été décrite par Y. Kato et al. (J. Chromato. 245, 1982, 193-211) et recommandée pour des séparations chromatographiques à moyenne performance et à l'échelle industrielle de protéines de très grande taille. La capacité de rétention-élution de ce gel repose sur un faible pouvoir d'échange ionique et sur la dimension importante des pores.

Ainsi la Demanderesse a montré que ce type de

gel permettait d'adsorber préférentiellement les complexes de très grande taille qui se forment entre le Facteur VIII et le facteur von Willebrand. De plus, la Demanderesse a, par le choix des tampons d'équilibrage et d'élution, tiré parti de liaisons faiblement hydrophobes qui s'établissent grâce à la rétention prolongée des complexes de grande taille sur le support polyvinyle. Cet avantage du gel n'avait pas été mis en évidence précédemment.

En utilisant une telle résine pour traiter une fraction de plasma contenant du Facteur VIII, par exemple une solution pré-purifiée du cryoprécipité, on obtient, dans des conditions de tampon appropriées, un concentré de Facteur VIII de très haute pureté, et de qualité assimilable à celle d'un concentré de plasma Isogroupe, à une concentration de l'ordre de 50 UI/ml (activité spécifique supérieure à 100 UI/mg) sans avoir à recourir à une étape d'ultrafiltration, et de grande stabilité, c'est-à-dire qui ne nécessite pas l'adjonction d'un stabilisant de nature protéique. On obtient aussi, par la même chromatographie, des fractions enrichies en fibrinogène, en fibronectine et en facteur von Willebrand, répondant aux paramètres physico-chimiques satisfaisant à un usage thérapeutique ou à titre de réactif. De plus le fibrinogène peut être concentré davantage pour être utilisé comme colle biologique, selon la demande de brevet européenne 88.401961.3.

La mise en oeuvre du procédé selon l'invention s'effectue comme suit. La fraction de plasma prépurifiée et contenant les protéines majeures du cryoprécipité, c'est-à-dire le fibrinogène, le Facteur VIII, la fibronectine et le facteur von Willebrand, passe sur une résine échangeuse d'anions telle que spécifiée ci-dessus ; le Facteur VIII, le facteur von Willebrand (la totalité ou une grande partie, selon la quantité de matériel de départ) et la fibronectine s'adsorbent sur la résine tandis que le fibrinogène se retrouve dans le filtrat des protéines non adsorbées.

Par une première augmentation de la force ionique du tampon on élue la fibronectine et une grande partie du facteur von Willebrand.

Par une augmentation supplémentaire de la force ionique du tampon le Facteur VIII s'élue en présence de faibles quantités de facteur von Willebrand et peut être directement lyophilisé sans qu'il soit nécessaire de lui ajouter un stabilisant ou de le soumettre à une étape d'ultrafiltration.

Le tampon utilisé contient avantagereusement de la lysine à une dose de l'ordre de 2 à 4 g/l ainsi que du glyccolol à une dose de l'ordre de 8 à 11 g/l. L'utilisation d'autres acides aminés ou même de l'un seulement de ces deux acides aminés donne des résultats nettement moins satisfaisants.

L'augmentation de la force ionique du tampon se fait par adjonction de chlorure de sodium. En effet, l'utilisation unique de cette résine de caractère ionique modéré et de nature légèrement hydrophobe permet d'utiliser ce sel pour désorber le facteur von Willebrand avant l'élution du Facteur VIII ce qui évite le recours au chlorure de calcium, qu'il serait ensuite nécessaire d'éliminer par ultrafiltration, pour dissocier Facteur VIII:C et facteur von

Willebrand.

On peut bien entendu prévoir un traitement d'inactivation virale selon une technique connue, à un stade quelconque du procédé. Dans le cas où on utilise un agent chimique d'inactivation virale, il sera judicieux d'effectuer cette inactivation juste avant le passage de la fraction de plasma sur la résine. De cette façon l'étape chromatographique servira à l'élimination efficace des agents d'inactivation.

On a obtenu de bons résultats en utilisant la technique d'inactivation par solvant-détergent, telle que décrite dans la demande de brevet européen No 0 131 740.

Pour la préparation de Facteur VIII l'étape de chromatographie peut être réalisée sur toute fraction protéique le contenant, par exemple sur une fraction plasmatique cryoprécipitée prépurifiée qui a été soumise à un traitement au gel d'alumine éventuellement suivi d'une précipitation à basse température, selon des méthodes classiques de production de concentrés de Facteur VIII, qui ont été décrites dans la demande de brevet européen 86.104297.6.

L'activité spécifique du Facteur VIII:C dans la fraction de départ peut être aussi basse que 0,1 UI/mg. Le facteur de purification obtenu par une seule étape de chromatographie d'échange d'anions est selon l'invention de l'ordre de 400 à 700 fois. Le rendement de cette étape est compris entre 75 et 90%.

Le concentré de Facteur VIII obtenu est de très haute pureté, son activité spécifique étant supérieure à 100 UI/mg de protéines. Il est dépourvu de fibrinogène et d'immunoglobulines G et il est nettement appauvri en fibronectine. Ce produit est dépourvu ou ne contient que des doses infimes d'anticorps humains de groupe et est ainsi assimilable à un concentré de qualité isogroupe selon les normes préconisées par la Pharmacopée Européenne, ceci même en utilisant comme matériel d'origine un plasma non sélectionné par groupe sanguin. Il peut donc être très avantageusement utilisé en thérapeutique et tout particulièrement dans le traitement de l'hémophilie A qui nécessite des injections couramment répétées. Il peut également être utilisé comme réactif dans tout test ou analyse nécessitant un Facteur VIII de très haute pureté.

Les autres fractions séparées par cette colonne de chromatographie sont également intéressantes pour les protéines qu'elles contiennent, à savoir respectivement le fibrinogène, d'une part, qui est récupéré dans le premier filtrat, et d'autre part la fibronectine et le facteur von Willebrand qui sont élusés par la première augmentation de la force ionique du tampon.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

Exemple 1

A) Prépurification et inactivation virale

On utilise comme matériau de départ un cryoprécipité de plasma humain, remis en suspension dans une solution aqueuse d'héparine sodique (à 2 U/ml)

et contenant du Facteur VIII à une activité spécifique comprise entre 0,6 et 1,1 UI/mg.

Le pH de la suspension est ajusté à 7-7,1 avec de l'acide acétique 0,1 M.

Cette suspension de cryoprécipité est soumise à une prépurification par traitement au gel d'alumine et précipitation à froid. On ajoute à la suspension de l'hydroxyde d'alumine (108 g d'Al(OH)₃ à 20% pour 1kg de cryoprécipité) sous agitation pendant 5 minutes à température ordinaire. On ajuste le pH à 6,5-6,6 avec de l'acide acétique 0,1 M puis on refroidit la suspension à 14-16°C, sous agitation. Dès que la température voulue est atteinte, on centrifuge à 14-16°C, on récupère le surnageant et on le stérilise par filtration.

Cette solution prépurifiée est soumise à un traitement d'inactivation virale par solvant-détergent, en présence de Tween-TNBP, suivant la méthode décrite dans la demande de brevet européen n° 0 131 740.

B) Séparation chromatographique sur Fractogel TSK-DEAE

On prépare une colonne de chromatographie avec de la résine Fractogel TSK-DEAE 650 (M) (Merck). On prévoit une quantité de 0,5 L de Fractogel par kg de cryoprécipité. La colonne est lavée par 5 volumes de solution de NaCl 0,1 M puis équilibrée avec le tampon suivant :

citrate de sodium trisodique (2,94 g/l), chlorure de calcium (1mM), chlorure de sodium (0,11M), glyco-colle (9 g/l), et lysine (3 g/l).

La solution de cryoprécipité prépurifiée décrite au paragraphe A) est injectée sur la colonne.

Le filtrat et les éluats suivants sont récupérés et leur teneur en protéines est suivie par la mesure de l'absorption à 280 nm (notée ci-après D.O.).

Le premier filtrat montre un pic de protéines non adsorbées par la colonne qui correspond essentiellement au fibrinogène (voir exemple 3).

Après passage de ce pic, quand la D.O. est retombée à la ligne de base, on élue la colonne avec le même tampon dont on augmente une première fois la force ionique par addition de NaCl, à une concentration finale de 0,15 M. Ce tampon désorbe un pic de protéines contenant la plus grande partie du facteur von Willebrand et de la fibronectine (voir exemple 4).

Après passage de ce pic, quand la D.O. est retombée à la ligne de base, on augmente une deuxième fois la force ionique du tampon par addition de NaCl à la concentration finale de 0,25 M.

Dans ces conditions le Facteur VIII s'élue à une concentration de l'ordre de 30 à 40 UI/ml.

Exemple 2 : Préparation du concentré de Facteur VIII

La solution de Facteur VIII obtenue par le procédé chromatographique décrit dans l'exemple 1 est suffisamment pure et concentrée pour être directement conditionnée en flacons et lyophilisée, sans étape supplémentaire d'ultrafiltration.

La concentration peut éventuellement être ajustée par dilution avec le même tampon d'élution pour ajuster l'activité spécifique par flacon selon des normes légales.

La composition moyenne des solutions récoltées est la suivante :

Protéines (g/l)	0,16 - 0,25
Facteur VIII:C(UI/ml)	30-45
Activité spécifique du Facteur VIII:C (UI/mg)	120 - 250
Fibrinogène (g/l)	<0,1
Facteur von Willebrand : Ag (U/ml)	11 - 23
Facteur von Willebrand : RCO (U/ml)	10 - 20
Facteur VIII:Ag (U/ml)	35 - 60
IgG (mg/ml) (Néphélimétrie)	<0,011
Anticorps anti-A naturels et immuns	0 - 2
Fibronectine (mg/l)	15 - 40

Après lyophilisation, la solubilité du produit est instantanée et le produit est limpide. Le taux de Facteur VIII:C est stable sur 24 heures à température ambiante.

Les injections sur l'homme indiquent une récupération du Facteur VIII:C comparable à celle obtenue avec les produits de moindre pureté. De même la demi-durée de vie est équivalente à celle des autres produits.

Ce concentré s'avère être un produit de très haute valeur thérapeutique, particulièrement adapté aux injections répétées nécessaires dans le traitement de l'hémophilie A.

Exemple 3 : Purification d'un concentré de fibrinogène

Le premier filtrat de la chromatographie sur DEAE-Fractogel décrit dans l'exemple 1 contient principalement du fibrinogène mais aussi de l'albumine, des immunoglobulines et les agents d'inactivation virale (Tween et TNBP).

Le fibrinogène est purifié à partir de cette solution par une nouvelle étape de chromatographie sur colonne de résine d'héparine-sépharose.

Cette chromatographie est effectuée dans le même tampon que la précédente, ajusté à 0,06 M en NaCl, ce qui permet d'éviter une dialyse entre les deux chromatographies.

Le filtrat de la première chromatographie est dilué pour obtenir une osmolarité de 280 mosM à un pH de 6,5 avant d'être injecté sur la deuxième colonne. On retrouve dans le second filtrat, l'albumine, les immunoglobulines, le Tween et le TNBP. Le fibrinogène est adsorbé sur la colonne.

Quand la D.O. du filtrat est retombée au niveau de base, on élue la colonne avec le même tampon après avoir augmenté sa force ionique par addition de NaCl à une concentration finale de 0,16 M.

La fraction de fibrinogène recueillie est ensuite concentrée et dialysée sur un système de cassette. Le produit concentré est réparti en flacons et lyophilisé.

Ce fibrinogène concentré répond aux normes de qualité fixée par la Pharmacopée européenne.

En outre il peut servir de substrat pour la préparation de colle biologique selon la demande de brevet européenne n°88.401961.3

Exemple 4 : Préparation de concentré de facteur von Willebrand

La fraction élue de la chromatographie sur DEAE-Fractogel en présence de 0,15 M de NaCl, décrite dans l'exemple 1, est fort enrichie en facteur von Willebrand et en fibronectine. Elle renferme encore du Tween et du TNBP.

Cette fraction est diluée pour amener son osmolarité à 385-390 mosM avec le tampon de base de chromatographie (citrate trisodique, chlorure de calcium, lysine, glycine, pH 7, osmolarité 18 mosM).

Elle est ensuite injectée sur une deuxième colonne de DEAE-Fractogel, équilibrée avec le même tampon que précédemment et contenant du NaCl à une concentration finale de 0,11 M, ajusté à pH 7 et 387 mosM.

Dans ces conditions on assure une très bonne élimination du Tween et du TNBP.

La solution de départ étant déjà très concentrée en facteur von Willebrand, la fixation de celui-ci sur la colonne est nettement plus grande qu'au cours du passage sur la première colonne. La capacité de fixation de la colonne est d'au moins 160 U Ag/ml (unité d'antigène de facteur von Willebrand) ou de 100 U RCO/ml (unités de cofacteur de ristocétine).

L'élution de la fraction contenant le facteur von Willebrand s'effectue par addition au tampon de NaCl à une concentration finale de 0,15 M.

La solution de facteur von Willebrand élue est suffisamment concentrée pour ne pas nécessiter d'ultrafiltration supplémentaire ; elle est répartie en flacons et lyophilisée.

Le concentré obtenu est de très haute pureté et présente une activité spécifique supérieure à 100 U RCO/mg. Il contient encore de la fibronectine mais celle-ci ne nuit pas à son activité.

Exemple 5 : Préparation d'un concentré de fibronectine

On peut également préparer un concentré de fibronectine à partir du même éluat de départ que dans l'exemple 4.

On peut en effet séparer le facteur von Willebrand et la fibronectine sur la base de leur différence de poids moléculaires. Par tamisage moléculaire sur colonne de Séphacryl S-400 (R) (Pharmacia) par exemple, on sépare une première fraction de haut poids moléculaire qui contient le facteur von Willebrand et ensuite une fraction qui contient la fibronectine qui peut être directement conditionnée et lyophilisée.

Revendications

1 - Procédé de séparation de protéines du plasma humain ou animal, caractérisé en ce qu'on soumet une fraction solubilisée d'un cryoprécipité de plasma à une étape unique de chromatographie sur une résine échangeuse d'anions de caractère ionique modéré, permet-

tant la rétention de molécules de très grande taille et favorisant la mise en jeu d'interactions hydrophobes, et on récupère sélectivement chacune des protéines par augmentation de la force ionique du tampon d'élution.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fraction de départ est un cryoprécipité de plasma qui contient du Facteur VIII, du facteur von Willebrand, du fibrogène et de la fibronectine.

3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'activité spécifique du Facteur VIII:C dans la fraction de départ est supérieure ou égale à 0,1 UI/mg.

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la fraction de départ a subi un traitement de prépurification comprenant :

- un traitement à l'hydroxyde d'aluminium
- un refroidissement à 14-16°C,
- une centrifugation et la récupération du surnageant.

5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) on fait passer la fraction solubilisée de cryoprécipité sur une résine comportant des groupements DEAE greffés sur un gel de type polymère vinylique, qui adsorbe le Facteur VIII, une grande partie du facteur von Willebrand et la fibronectine et laisse passer dans l'éluat le fibrinogène,

b) on augmente une première fois la force ionique du tampon pour éluer la fibronectine et une grande partie du facteur von Willebrand, et

c) on augmente encore la force ionique du tampon pour éluer le Facteur VIII.

6 - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le tampon contient de la lysine et du glycocolle.

7 - Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le tampon contient 2 à 4 g/l de lysine et 8 à 11 g/l de glycocolle.

8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 ,caractérisé en ce qu'on augmente la force ionique du tampon à l'aide de chlorure de sodium.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la concentration en chlorure de sodium est de 0,11 M pour l'étape a), de 0,15 M pour l'étape b) et de 0,25 M pour l'étape c).

10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,caractérisé en ce qu'on effectue un traitement d'inactivation virale en présence d'agents chimiques d'inactivation sur la fraction de plasma juste avant de la soumettre à l'étape de séparation chromatographique.

11 - Concentré de Facteur VIII de qualité assimilable à celle d'un concentré isogroupe, d'activité spécifique supérieure à 100 UI/mg, caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 10.

12 - Concentré de fibrinogène caractérisé en

ce qu'il consiste en l'éluat de l'étape a) du procédé selon la revendication 5, purifié par une étape supplémentaire de chromatographie sur résine d'héparine-sépharose.

13 - Concentré de facteur von Willebrand caractérisé en ce qu'il consiste en l'éluat de l'étape b) du procédé selon la revendication 5, purifié par une étape supplémentaire de chromatographie sur la même résine que l'étape a) et élution par le même tampon ajusté à 0.15 M en NaCl.

14 - Concentré de fibronectine caractérisé en ce qu'il consiste en l'éluat de l'étape b) du procédé selon la revendication 5, purifié par une étape supplémentaire de tamisage moléculaire.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 89 40 0348

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
A	WO-A-8 604 486 (NEW YORK UNIVERSITY) ---		C 07 K 3/22
A	EP-A-0 176 926 (MILES LABORATORIES INC.) ---		C 07 K 15/06 // A 61 K 35/16
A	EP-A-0 237 981 (BIOTEST PHARMA GmbH) -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			C 07 K 3/00 C 07 K 15/00 A 61 K 35/00
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	09-05-1989	NOVOA Y SANJURJO M.A.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			